



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0044444

(51)^{2020.01} A01P 1/00; A01N 27/00

(13) B

(21) 1-2021-08302

(22) 23/12/2021

(45) 25/03/2025 444

(43) 26/06/2023 423A

(71) 1. Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội (VN)

Tòa 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

2. Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ (VN)

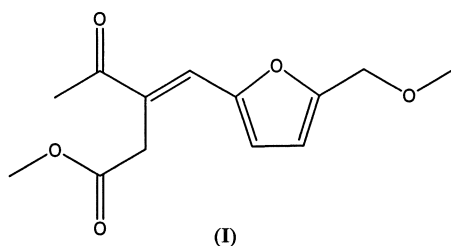
Toà nhà A28, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Lê Thị Phương Quỳnh (VN); Nguyễn Tiến Đạt (VN); Dương Thị Thuỷ (VN);
Nguyễn Thị Hồng Anh (VN); Đặng Viết Hậu (VN); Lê Như Đa (VN).

(54) HỢP CHẤT KHUNG FURAN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY
TỪ HOA CÂY CÚC VÀNG CHRYSANTHEMUM INDICUM

(21) 1-2021-08302

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam độc được phân lập từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate có công thức (I). Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất khung furan này từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*). Hợp chất khung furan theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa* hữu ích dùng để kiểm soát sự bùng phát vi khuẩn lam ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất khung furan, cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất methyl (E)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate được phân lập từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*). Hợp chất khung furan theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*, hữu ích dùng để kiểm soát sự bùng phát vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa* ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất khung furan này từ hoa cây cúc vàng *Chrysanthemum indicum*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong các nghiên cứu về thành phần từ cây hoa cúc, Selvaraj Arokiyaraj năm 2014 đã công bố một phương pháp tổng hợp chế phẩm nano sử dụng dịch chiết từ cây hoa cúc *Chrysanthemum indicum*, trong đó dịch chiết từ cây hoa cúc được phối hợp với nano bạc tạo nên cấu trúc kháng khuẩn và gây độc tế bào. Quá trình sàng lọc thành phần hoá học của cây *Chrysanthemum indicum* cho thấy sự hiện diện của các lớp chất như flavonoid, terpenoid và glycosit, điều này cho thấy rằng các hợp chất này hoạt động như các chất khử và có tác dụng ổn định các hạt nano. Sản phẩm nano bạc tổng hợp thể hiện hiệu quả kháng khuẩn *Klebsiella* gây viêm phổi, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* ở nồng độ 25 µg/ml. Các nghiên cứu cho thấy sản phẩm hạt nano bạc không gây độc đối với tế bào nguyên bào phôi chuột 3T3 ở nồng độ 25 µg/mL (Selvaraj arokiyaraj et al., Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* and its antibacterial and cytotoxic effects: an in vitro study, *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9, 379–388). Các vi khuẩn *Bacillus cereus* và *Listeria monocytogenes* có khả năng sống sót cao khi áp suất thẩm thấu môi trường thay đổi.

Năm 2012 Nateepat Pitinidhipat đã công bố nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn *Bacillus cereus* và *Listeria monocytogenes* 10403S của dịch chiết loài Hoa cúc, trong điều kiện bình thường và trong điều kiện áp suất thẩm thấu môi trường chứa (5% NaCl) bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả sàng lọc kháng khuẩn trong ống nghiệm của cao ethanol 95% trong điều kiện bình thường cho thấy loài *Chrysanthemum indicum* có

đường kính kháng *Bacillus cereus* đạt $1,17 \pm 0,85$ mm. Ngược lại, cao chiết từ cón của loài này không có tác dụng kháng *L. monocytogenes*. Trong điều kiện áp lực thẩm thấu, hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết etanol 95% đã tăng gấp đôi, trong đó giá trị MIC của cao chiết từ cây hoa cúc *Chrysanthemum indicum* có khả năng ức chế kháng *Bacillus cereus* ở nồng độ là 16 $\mu\text{l/ml}$ (Nateepat Pitinidhipat et al., Antibacterial activity of *Chrysanthemum indicum*, *Centella asiatica* and *Andrographis paniculata* against *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* under osmotic stress, *AU Journal of Technology*, 2012, 15(4), 239-245).

Thành phần tinh dầu của cây hoa Cúc *Chrysanthemum indicum* và *Chrysanthemum morifolium* đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký khí/đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC/FID) và phân tích sắc ký khí/khối phổ (GC/MS). Hoạt tính chống virus đã được xác định bằng phương pháp làm giảm mảng bám chống lại ba loại virus phổ biến cụ thể là *Herpes simplex type-1* (HSV-1), viêm gan A (HAV) và virus viêm miệng (VSV). Ngoài ra, việc đánh giá khả năng kháng khuẩn *Mycobacteria* và tác dụng kháng *Helicobacter pylori* đã được báo cáo. Kết quả cho thấy, long não là thành phần chính của cả hai loại dầu chiếm lần lượt 36,69 và 14,56% trong tinh dầu từ *Chrysanthemum indicum* và *Chrysanthemum morifolium*. Đáng chú ý là tinh dầu từ loài *Chrysanthemum indicum* thể hiện hoạt tính sinh học mạnh hơn trong tất cả các thử nghiệm, trong đó loài này thể hiện hoạt tính kháng bệnh truyền nhiễm với giá trị IC_{50} bằng 45,89 $\mu\text{g/mL}$ và có khả năng kháng khuẩn *Streptococcus agalactiae* với giá trị MIC là 62,5 $\mu\text{g/mL}$, đồng thời cũng ức chế sự tái bản vi sinh vật với giá trị IC_{50} là 3,14 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu này cung cấp thêm bằng chứng về việc sử dụng cả tinh dầu hoa cúc *Chrysanthemum indicum* và *Chrysanthemum morifolium* làm chất viêm nhiễm trong các bài thuốc cổ truyền. Ngoài ra, chúng có thể được sử dụng làm gia vị trong thực phẩm và có thể được kết hợp trong các sản phẩm thực phẩm khác nhau và các chế phẩm dược phẩm như chất bảo quản tự nhiên có khả năng chống oxy hóa (Fadia S. Youssef, và cộng sự. *Chrysanthemum indicum* and *Chrysanthemum morifolium*: Chemical composition of their essential oils and their potential use as natural preservatives with antimicrobial and antioxidant activities, *Foods*, 2020, 9, 1460).

Hoa cúc là một cây thảo thuộc họ Bách hợp là một loại thảo dược quan trọng được sử dụng rộng rãi và phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới. Hầu hết tất cả các bộ phận của cây hoa cúc đều được sử dụng trong các bài thuốc y học cổ truyền và hiện đại, trong đó, lá và

hoa là bộ phận quan trọng nhất trong lĩnh vực thuốc và dược phẩm. Trong công trình nghiên cứu của Rajalakshmi và các cộng sự năm 2013, hoạt tính kháng khuẩn của các chất chiết xuất từ lá loài *Chrysanthemum indicum* đã được công bố. Ngoài ra, loài này còn được phát hiện có hoạt tính kháng một số mầm bệnh. Cao chiết etanol của Hoa cúc *Chrysanthemum indicum* cho thấy mức độ ức chế kháng *Klebsiella pneumonia* và *Escherichia coli* ở mức cao, kháng *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ở mức trung bình và kháng *Staphylococcus aureus* ở mức tối thiểu (G.Rajalakshmi, và cộng sự. *In-vitro Micropropagation and antimicrobial activity of C. indicum*, *Sch. Acad. J. Pharm*, 2013, 2(4), 285-288].

Năm 2009 Eun-Kyung Jung đã công bố nghiên cứu phân tích thành phần dầu loài hoa cúc *Chrysanthemum indicum*. Các thành phần hóa học của tinh dầu được phân tích bằng phương pháp GC-MS và đã xác định được 73 hợp chất chiếm 96,65% lượng tinh dầu chiết xuất được. Các hợp chất chính trong dầu bao gồm α -pinen (4,4%), 1,8-cineole (10,4%), α -thujone (6,05%), long não (10,12%), terpinen-4-ol (3,4%), bornyl axetat (6,1%), borneol (3,6%), *cis*-chrysanthenol (3,4%), β -caryophyllene (5,1%), germacrene D (10,6%), và α -cadinol (3,0%). Tinh dầu của *Chrysanthemum indicum* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh, đặc biệt là có khả năng kháng lại tất cả các vi khuẩn miệng được thử nghiệm với giá trị MIC từ 0,1 đến 1,6 mg/ml, MBC từ 0,2 đến 3,2 mg/ml. Hơn nữa, các giá trị MIC/MBC đã giảm xuống còn một nửa khi kết hợp tinh dầu với ampicillin hoặc gentamicin cho tất cả các vi khuẩn miệng. Tác dụng diệt khuẩn mạnh đã được sử dụng khi phối hợp thuốc. Dữ liệu nghiên cứu trong *in vitro* cho thấy rằng tinh dầu của *Chrysanthemum indicum* khi kết hợp với các kháng sinh khác có thể có lợi về mặt vi sinh và tác dụng hiệp đồng (Eun-Kyung Jung, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *C. indicum* against oral bacteria, *Journal of Bacteriology and Virology*, 2009, 39(2), 61-69).

Năm 2005 Zhu Shunying cùng các cộng sự đã tiến hành nghiên cứu ba loại tinh dầu từ ba mẫu hoa *Chrysanthemum indicum* bao gồm hoa tươi, làm khô trong không khí và hoa đã qua chế biến thu được bằng phương pháp chưng cất cuốn hơi nước, và được phân tích bằng phương pháp GC-MS. Kết quả cho thấy thành phần chính của ba loại dầu là 1,8-cineole, long não, borneol và bornyl axetat, nhưng tỷ lệ các hợp chất này thay đổi mạnh tùy theo quá trình xử lý hoa. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ hoa cúc đã qua xử lý và sấy khô trong không khí được thử nghiệm với 15 loại vi sinh vật bao gồm nấm men và

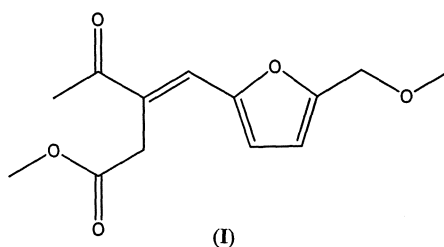
vi khuẩn phân lập lâm sàng bằng cách sử dụng đĩa giấy và phương pháp pha loãng nước. Kết quả của cho thấy rằng cả hai loại tinh dầu đều có tác dụng kháng khuẩn đáng kể, tuy nhiên có một số khác biệt trong hoạt tính kháng khuẩn giữa hai loại dầu đã được quan sát thấy đối với một số vi sinh vật, dầu của hoa đã được xử lý trong nhiều trường hợp thể hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn mạnh hơn so với so với tinh dầu thu từ Hoa được làm khô trong không khí. Điều này được cho là do sự biến đổi theo tỷ lệ phần trăm của long não trong dầu hoa được xử lý cao hơn so với hoa để khô trong không khí (Zhu Shunying, và cộng sự. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96, 151–158).

Mặc dù có nhiều nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất kháng khuẩn, kháng nấm, tuy nhiên, việc phát triển các hoạt chất cũng như chế phẩm nhằm đối phó với các vấn đề liên quan đến môi trường, như xử lý tảo lam gây độc nguồn nước vẫn chưa được đề cập. Do đó vẫn cần có những nghiên cứu nhằm tìm kiếm, phân lập các hoạt chất mới, tốt nhất là các hoạt chất có nguồn gốc từ tự nhiên, có hoạt tính ức chế sự phát triển của tảo lam nhằm mục đích ngăn ngừa, kiểm soát sự bùng phát vi khuẩn lam ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi thủy sản, nhằm bảo vệ ngành nuôi thủy sản, giảm thiểu các tác động sinh thái do tảo độc gây ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm mục đích giải quyết vấn đề nêu trên, cụ thể với mục đích tìm kiếm các hoạt chất có hoạt tính sinh học, sáng chế đề xuất hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam gây độc môi trường nước và phương pháp phân lập hợp chất này từ hoa cây hoa cúc vàng *Chrysanthemum indicum*.

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam độc được phân lập từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*), trong đó hợp chất này là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate) có công thức (I) sau:



Hợp chất methyl (E)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate) theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*, hữu ích để phòng ngừa và kiểm soát sự bùng phát vi khuẩn lam độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất khung furan theo sáng chế từ hoa cây cúc vàng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu, trong đó tiến hành thu gom hoa tươi từ cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) rồi rửa sạch, sấy khô rồi xay thành bột thô thu được nguyên liệu hoa cây cúc vàng dạng bột khô;

b) chiết sơ bộ nguyên liệu bằng cách ngâm chiết bột hoa cây cúc vàng trong dung môi axit HCl 1N theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 4 giờ, lọc bỏ phần bã, phần dịch chiết được gom và cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết tổng đặc;

c) chiết phân bố bằng ethyl acetat bằng cách hòa tan phần cao chiết tổng đặc với nước theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) rồi bổ sung dung môi ethyl acetat 97% theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là 1/2 (theo thể tích) và khuấy trộn đều, sau đó tách phân đoạn dung môi, chiết lặp lại phân đoạn dịch chiết từ 2 đến 5 lần, phần dung môi được thu gom rồi cất loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm được cao chiết ethyl acetat đặc;

d) tách phân đoạn giàu hợp chất flavonoid bằng cách nhồi cao chiết ethyl acetat lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ silicagel theo tỷ lệ cao chiết ethyl acetat/silicagel là 1/10 (theo khối lượng), rửa giải bằng dung môi diclometan, sau đó thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất flavonoid;

e) tinh chế nhóm hợp chất flavonoid bằng cách nhồi cao đặc giàu hợp chất flavonoid lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất flavonoid/silicagel là 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch;

f) phân lập nhóm giàu hợp chất khung furan bằng cách nhồi cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch lên cột sắc ký pha đảo với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao

đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch/silicagel là 1/50 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất khung furan; và

g) thu hợp chất khung furan tinh sạch bằng cách nhồi cao đặc giàu hợp chất khung furan lên cột sắc ký silicagel pha thường theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất khung furan/silicagel là 1/50 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi hexan/ethyl acetat theo tỷ lệ 2/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất khung furan tinh sạch là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate dạng bột màu vàng nhạt.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

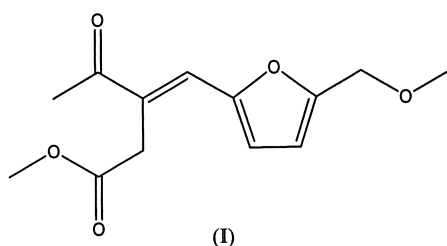
Hình 1: phổ ESI-MS của hợp chất methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate có công thức (I).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết có viện dẫn đến các ví dụ và phương án thực hiện cụ thể. Tuy nhiên, các phương án thực hiện và ví dụ thực hiện cụ thể này không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đều thuộc phạm vi của sáng chế và được xác định trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Sáng chế đề cập đến hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam độc và phương pháp phân lập hợp chất khung furan này từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*).

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam độc. Hợp chất khung furan theo sáng chế được phân lập từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*), trong đó hợp chất này là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate) có công thức (I) sau:



Hợp chất methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate) có công thức (I) theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*. Hợp chất này có hoạt tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam, hữu ích dùng để phòng ngừa và kiểm soát sự bùng phát vi khuẩn lam độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản.

Hợp chất khung furan theo sáng chế có công thức (I) nêu trên ở dạng chất bột màu vàng nhạt có công thức phân tử là $C_{13}H_{16}O_5$. Các thông số xác định như sau:

Phổ khối phun mù điện tử ESI-MS m/z : 253 $[M + H]^+$

1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_H 7.35 (1H, s, H-4), 6.69 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-6), 6.45 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-7), 4.18 (2H, s, H-9), 3.80 (2H, s, H-2), 3.38 (3H, br s, 9- OCH_3), 3.67 (3H, br s, $COOCH_3$), 2.44 (3H, br s, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ_C 171.5 (C-1), 32.0 (C-2), 130.7 (C-3), 128.4 (C-4), 150.6 (C-5), 117.6 (C-6), 111.7 (C-7), 155.0 (C-8), 66.4 (C-9), 197.9 (C-10), 25.2 (C-11), 58.2 (OCH_3), 51.9 ($COOCH_3$).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất khung furan theo sáng chế từ hoa cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*), trong đó phương pháp này bao gồm các bước chuẩn bị nguyên liệu, chiết sơ bộ nguyên liệu, chiết phân bố bằng ethyl acetat, tách phân đoạn giàu hợp chất flavonoid, tinh chế nhóm hợp chất flavonoid, phân lập nhóm hợp chất khung furan, và thu hợp chất khung furan tinh sạch.

Theo sáng chế, nguyên liệu được sử dụng là hoa của cây cúc vàng. Cây cúc vàng có tên khoa học là *Chrysanthemum indicum*, là một loài thực vật có hoa trong họ Cúc (Asteraceae) phân bố ở châu Á và đông bắc châu Âu, là dạng cây bụi lâu năm dạng thảo mộc, lá xếp xen kẽ, cụm hoa phức gồm một dãy đầu hoa hoặc hoa đơn. Đế hoa được bao phủ bởi lớp lá bắc, hoa có hàng con tia màu trắng, vàng hoặc đỏ, thường được sử dụng làm cảnh, trưng bày. Trong hoa cúc chứa nhiều tinh dầu, nguyên tố vi lượng, hoa chứa selen có khả năng khử gốc tự do, chống lão hóa, chứa crom, phòng chống tim mạch. Theo y học cổ truyền, hoa cúc có vị ngọt, cay, tác động vào ba kinh gồm kinh phế, kinh can và kinh thận. Trong cây chứa pyrethrum là một loại nguyên liệu để pha chế thuốc trừ sâu dưới dạng nhựa dầu, chúng tác động lên hệ thống thần kinh của côn trùng. Nguyên liệu được sử dụng theo sáng chế là hoa của cây hoa cúc *Chrysanthemum indicum*.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành thu gom hoa tươi từ cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) rồi rửa sạch. Sau khi sấy khô, rồi xay thành bột thô thu được nguyên liệu hoa cúc vàng dạng bột khô.

Trong bước chiết sơ bộ nguyên liệu, quá trình này được thực hiện nhằm chiết các nhóm hoạt chất kiềm từ nguyên liệu. Tiến hành ngâm chiết bột hoa cúc vàng trong dung môi axit HCl 1N theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích). Sau đó đun hồi lưu trong khoảng thời gian 4 giờ, lọc bỏ phần bã. Quá trình này có thể lặp lại từ 1 đến 3 lần để chiết triệt để nhóm chất flavonoid trong nguyên liệu. Phần dịch chiết được gom và cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết tổng đặc.

Trong bước chiết phân bố bằng ethyl acetat, tiến hành hòa tan phần cao chiết tổng đặc với nước theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích). Sau đó bổ sung dung môi ethyl acetat 97% theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là $\frac{1}{2}$ (theo thể tích) và khuấy trộn đều. Hỗn hợp được để tách phân đoạn và phần dung môi được thu gom. Tiến hành chiết lặp lại phân đoạn dịch chiết từ 2 đến 5 lần. Phần dung môi được gộp chung rồi cất loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết ethyl acetat đặc.

Trong bước tách phân đoạn giàu hợp chất flavonoid, tiến hành nhồi cao chiết ethyl acetat lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ silicagel. Tỷ lệ cao chiết ethyl acetat được nhồi lên cột silicagel được sử dụng là cao chiết ethyl acetat/silicagel là 1/10 (theo khối lượng). Tiến hành rửa giải bằng dung môi diclometan. Kiểm tra các phân đoạn rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng. Sau đó thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất flavonoid.

Trong bước tinh chế nhóm hợp chất flavonoid bằng cách nhồi cao đặc giàu hợp chất flavonoid lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ là silicagel. Tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất flavonoid được nhồi lên cột silicagel được sử dụng theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất flavonoid/silicagel là 1/20 (theo khối lượng). Rửa giải bằng hệ dung môi hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1 (theo thể tích). Kiểm tra các phân đoạn rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng. Sau đó, thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch.

Trong bước phân lập nhóm giàu hợp chất khung furan, tiến hành nhồi cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch lên cột sắc ký pha đảo. Tỷ lệ cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch được nhồi lên cột silicagel được sử dụng là cao đặc chứa nhóm

hợp chất flavonoit tinh sạch/silicagel là 1/50 (theo khối lượng). Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích). Kiểm tra các phân đoạn rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng. Sau đó thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất khung furan.

Trong bước thu hợp chất khung furan tinh sạch, tiến hành nhồi cao đặc giàu hợp chất khung furan lên cột sắc ký silicagel pha thường. Tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất khung furan được nhồi lên cột silicagel được sử dụng là cao đặc giàu hợp chất khung furan/silicagel là 1/50 (theo khối lượng). Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi hexan/ethyl acetat theo tỷ lệ 2/1 (theo thể tích). Kiểm tra các phân đoạn rửa giải bằng sắc ký lớp mỏng. Sau đó, thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất khung furan tinh sạch là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate dạng bột màu vàng nhạt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất khung furan từ hoa cây cúc Chrysanthemum indicum

Tiến hành thu hái hoa tươi từ cây cúc vàng *Chrysanthemum indicum* rồi rửa sạch, sấy khô rồi xay thành bột thô thu được nguyên liệu hoa cúc vàng dạng bột khô.

Chuyển bột hoa cúc vàng vào bình cầu, sau đó bổ sung dung môi axit HCl 1N theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 4 giờ. Sau đó lọc bỏ phần bã, phần dịch chiết được gom và cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết tổng đặc.

Hòa tan cao chiết tổng đặc với nước theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) thu được dịch chiết lỏng. Bổ sung dung môi ethyl acetat 97% theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là 1/2 (theo thể tích) và khuấy trộn đều. Sau khi để yên để hỗn hợp tách lớp, tách phân đoạn dung môi. Phần dịch chiết được bổ sung tiếp dung môi ethyl acetat 97% và chiết lặp lại 5 lần. Phần dung môi sau chiết được thu gom rồi cất loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết ethyl acetat đặc.

Nhồi cao chiết ethyl acetat lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ silicagel theo tỷ lệ cao chiết ethyl acetat/silicagel là 1/10 (theo khối lượng), rửa giải bằng dung môi diclometan. Sau đó thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất flavonoit.

Nhồi cao đặc giàu hợp chất flavonoit thu được ở trên lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất flavonoit/silicagel là 1/20 (theo khối lượng). Rửa giải bằng hệ dung môi hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1 (theo thể tích). Thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoit tinh sạch.

Tiếp tục nhồi cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoit tinh sạch lên cột sắc ký pha đảo với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoit tinh sạch/silicagel là 1/50 (theo khối lượng). Rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích). Thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất khung furan.

Nhồi cao đặc giàu hợp chất khung furan lên cột sắc ký silicagel pha thường theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất khung furan/silicagel là 1/50 (theo khối lượng). Rửa giải bằng hệ dung môi hexan/ethyl acetat theo tỷ lệ 2/1 (theo thể tích). Thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất khung furan tinh sạch là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate dạng bột màu vàng nhạt.

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc của hợp chất khung furan từ hoa cây cúc

Phần bột thu được từ Ví dụ 1 được đưa đi xác định cấu trúc hóa học bằng các số liệu phổ khối lượng phun mù điện tử ESI-MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Kết quả thu được như sau.

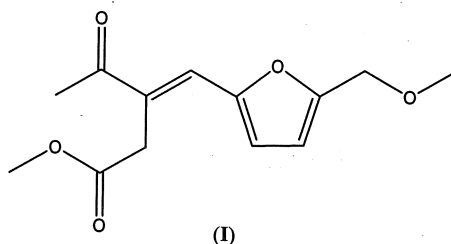
Hợp chất dạng bột rắn, màu vàng nhạt, công thức phân tử là $C_{13}H_{16}O_5$;

Phổ khối phun mù điện tử ESI-MS m/z : 253 $[M + H]^+$.

1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_H 7.35 (1H, s, H-4), 6.69 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-6), 6.45 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-7), 4.18 (2H, s, H-9), 3.80 (2H, s, H-2), 3.38 (3H, br s, 9-OCH₃), 3.67 (3H, br s, COOCH₃), 2.44 (3H, br s, H-11).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ_C 171.5 (C-1), 32.0 (C-2), 130.7 (C-3), 128.4 (C-4), 150.6 (C-5), 117.6 (C-6), 111.7 (C-7), 155.0 (C-8), 66.4 (C-9), 197.9 (C-10), 25.2 (C-11), 58.2 (OCH₃), 51.9 (COOCH₃).

Kết quả đánh giá, phân loại cho thấy hợp bột rắn, màu vàng nhạt thu được từ Ví dụ 1 là hợp chất có khung furan được xác định là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate có công thức (I):



Ví dụ 3: Thử nghiệm tác dụng ức chế sinh trưởng vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*

Để đánh giá hiệu quả ức chế sinh trưởng của vi khuẩn lam, tiến hành thử nghiệm ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam *Microcystis aeruginosa* gây độc nước. Vi khuẩn lam được nuôi cấy trong bình tam giác đến nồng độ định trước.

Hợp chất có công thức (I) thu được từ Ví dụ 1 ở dạng bột màu vàng nhạt được pha trong dimethyl sulfoxide (DMSO) với các nồng độ khác nhau ở mức nồng độ $\mu\text{g/ml}$ để đánh giá nồng độ IC_{50} . Mẫu đối chứng sử dụng dung dịch CuSO_4 với các nồng độ tương ứng.

Mẫu sau khi pha loãng được bổ sung vào trong bình tam giác có chứa sinh khối của *Microcystis aeruginosa*. Sau đó duy trì điều kiện nuôi cấy với các thông số như sau: nhiệt độ được thiết lập 25°C , quang chu kỳ là 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1000 lux. Sau 7 ngày nuôi cấy, các bình mẫu được lắc đều rồi hút 200 μL dung dịch chuyển vào phiên 96 giếng. Mật độ quang của các giếng ở bước sóng 679 nm được xác định nhằm đánh giá mức độ tăng trưởng của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*.

Tác dụng ức chế sinh trưởng được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = [\text{OD}_{\text{trắng}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}] / \text{OD}_{\text{trắng}} \times 100$$

Trong đó: $\text{OD}_{\text{mẫu}}$ là trị số mật độ quang của giếng được ủ với mẫu thử nghiệm.

$\text{OD}_{\text{trắng}}$ là trị số mật độ quang của giếng không ủ với mẫu thử nghiệm.

Bảng 2. Hoạt tính ức chế sinh trưởng vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*.

Mẫu thử nghiệm	Trị số IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hợp chất (I) theo sáng chế	21,5
CuSO_4	7,8

Kết quả cho thấy hợp chất (I) thể hiện tác dụng ức chế sinh trưởng vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa* rõ rệt với giá trị IC_{50} là 21,5 $\mu\text{g/ml}$, điều này cho thấy khả năng ứng dụng của hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, có khả năng thay thế cho các hóa chất dùng để khử khuẩn công nghiệp. Hợp chất theo sáng chế có nguồn gốc tự nhiên, hữu ích để phát triển các sản phẩm an toàn, thân thiện môi trường trong việc hỗ trợ kiểm soát ngăn ngừa sự bùng phát vi khuẩn lam độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy sản.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

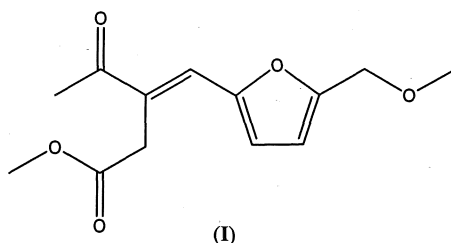
Hợp chất khung furan được phân lập methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate có công thức (I) từ hoa của cây cúc vàng *Chrysanthemum indicum* có khung furan thể hiện hoạt tính sinh học mạnh, cho phép ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam ở IC_{50} là 21,5 $\mu\text{g/ml}$, cho phép ứng dụng phát triển các chế phẩm cho phép kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn lam trong môi trường nước bị ô nhiễm, ngăn ngừa sự gây độc nguồn nước, bảo vệ thủy vực tự nhiên cũng như đầm hồ nuôi trồng thủy, hải sản.

Hợp chất khung furan theo sáng chế có nguồn gốc từ thực vật, an toàn, thân thiện với môi trường, cho phép ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*, tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm bào chế sản phẩm có tác dụng trong việc hỗ trợ kiểm soát ngăn ngừa sự bùng phát vi khuẩn lam độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản.

Phương pháp phân lập hợp chất khung furan từ hoa cây cúc vàng *Chrysanthemum indicum* cho phép thu được hợp chất methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate) tinh sạch, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp để phát triển các chế phẩm sinh học bảo vệ môi trường bền vững.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất khung furan có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn lam độc được phân lập từ hoa cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*), trong đó hợp chất này là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate có công thức (I) sau:



2. Phương pháp phân lập hợp chất khung furan theo điểm 1 từ hoa cây cúc vàng, trong đó phương pháp này gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu, trong đó tiến hành thu gom hoa tươi từ cây cúc vàng (*Chrysanthemum indicum*) rồi rửa sạch, sấy khô rồi xay thành bột thô thu được nguyên liệu hoa cây cúc vàng dạng bột khô;

b) chiết sơ bộ nguyên liệu bằng cách ngâm chiết bột hoa cây cúc vàng trong dung môi axit HCl 1N theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 4 giờ, lọc bỏ phần bã, phần dịch chiết được gom và cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết tổng đặc;

c) chiết phân bố bằng ethyl acetat bằng cách hòa tan phần cao chiết tổng đặc với nước theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) rồi bổ sung dung môi ethyl acetat 97% theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là 1/2 (theo thể tích) và khuấy trộn đều, sau đó tách phân đoạn dung môi, chiết lặp lại phân đoạn dịch chiết từ 2 đến 5 lần, phần dung môi được thu gom rồi cất loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm được cao chiết ethyl acetat đặc;

d) tách phân đoạn giàu hợp chất flavonoid bằng cách nhồi cao chiết ethyl acetat lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ silicagel theo tỷ lệ cao chiết ethyl acetat/silicagel là 1/10 (theo khối lượng), rửa giải bằng dung môi diclometan, sau đó thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất flavonoid;

e) tinh chế nhóm hợp chất flavonoid bằng cách nhồi cao đặc giàu hợp chất flavonoid lên cột sắc ký pha thường với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất flavonoid/silicagel là 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi hexan/axeton theo

tỷ lệ 3/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch;

f) phân lập nhóm giàu hợp chất khung furan bằng cách nhồi cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch lên cột sắc ký pha đảo với chất hấp phụ là silicagel theo tỷ lệ cao đặc chứa nhóm hợp chất flavonoid tinh sạch/silicagel là 1/50 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao đặc giàu hợp chất khung furan; và

g) thu hợp chất khung furan tinh sạch bằng cách nhồi cao đặc giàu hợp chất khung furan lên cột sắc ký silicagel pha thường theo tỷ lệ cao đặc giàu hợp chất khung furan/silicagel là 1/50 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi hexan/ethyl acetat theo tỷ lệ 2/1 (theo thể tích), thu gom dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất khung furan tinh sạch là methyl (*E*)-3-((5-(methoxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxopentanoate dạng bột màu vàng nhạt.

HÌNH 1

